

柘叶饲养对家蚕消化液中抗核多角体病毒 (BmNPV) 相关蛋白活性的影响

王晓强, 冯 伟, 谢洪霞, 周 围, 张 冉, 高 红, 万永继*

(西南大学生物技术学院, 重庆北碚 400716)

摘要: 为探讨柘叶 *Cudrania tricuspidata* 饲养家蚕 *Bombyx mori* 易感染核多角体病毒 (BmNPV) 的机制, 本实验比较研究了分别以柘叶和桑叶 *Morus alba* 饲养家蚕后其消化液中抗病毒蛋白活性的差异。结果表明: 家蚕经柘叶饲养后消化液中红色荧光蛋白 (red fluorescent protein, RFP) 的强度无明显变化, 但柘叶饲养蚕消化液中脂肪酶、胰蛋白酶的活性显著低于桑叶饲养蚕, 柘叶饲养蚕消化液中脂肪酶和胰蛋白酶的活性分别为 $1\,421.71 \pm 202.60$ U/L 和 19.67 ± 8.17 U/mL, 桑叶饲养蚕脂肪酶和胰蛋白酶的活性分别为 $1\,976.03 \pm 139.92$ U/L 和 199.18 ± 181.71 U/mL。这些结果说明, 消化液中脂肪酶和胰蛋白酶的活性水平低与柘叶饲养蚕易感染核型多角体病毒 (BmNPV) 可能相关。

关键词: 家蚕; 柘树; 家蚕核多角体病毒; 红色荧光蛋白; 脂肪酶; 胰蛋白酶

中图分类号: Q965.8 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2011)04-0404-05

Activities of anti-BmNPV proteins in digestive juice of the silkworm (*Bombyx mori*) reared on cudrang (*Cudrania tricuspidata*) leaves

WANG Xiao-Qiang, FENG Wei, XIE Hong-Xia, ZHOU Wei, ZHANG Ran, GAO Hong, WAN Yong-Ji*
(College of Biotechnology, Southwest University, Beibei, Chongqing 400716, China)

Abstract: It had been reported that silkworms *Bombyx mori* reared on cudrang (*Cudrania tricuspidata*) leaves are sensitive to *B. mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV). In order to explore the mechanisms of this phenomenon, we investigated the activities of different anti-BmNPV proteins in digestive juice of the silkworm reared on cudrang leaves and mulberry (*Morus alba*) leaves, respectively. The results showed that there was no significant change in intensity of red fluorescent protein (RFP) in the digestive juice of the silkworm reared on cudrang leaves. However, the enzymatic activities of lipase and trypsin in the silkworm reared on cudrang leaves were $1\,421.71 \pm 202.60$ U/L and 19.67 ± 8.17 U/mL, respectively, much lower than those of the silkworms reared on mulberry leaves, which were $1\,976.03 \pm 139.92$ U/L and 199.18 ± 181.71 U/mL, respectively ($P < 0.05$). The results suggest that the susceptibility of silkworms to BmNPV may be related with the lower activities of lipase and trypsin in digestive juice.

Key words: *Bombyx mori*; *Cudrania tricuspidata*; BmNPV; RFP; lipase; trypsin

由家蚕核多角体病毒 (*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus, BmNPV) 感染引发的家蚕血液型脓病是养蚕过程中常见的一种疾病, 它给世界养蚕国家的蚕茧生产造成了巨大的损失 (陈绳亮和李天宪, 2004)。深入研究 BmNPV 对家蚕的感染致病机制对控制该病的发生和流行具有重要的意义。目前研究认为家蚕的红色荧光蛋白 (red fluorescent protein, RFP)、脂肪酶和丝氨酸蛋白酶具有抗 BmNPV 的作用。20 世纪 70 年代, 日本学者 Hayashiya (1978) 认为家蚕消化道中的红色荧光蛋

白具有抗 BmNPV 的活性; Ponnuvel 等 (2003) 和 Nakazawa 等 (2004) 发现家蚕消化液中脂肪酶 (lipase) 和丝氨酸蛋白酶 (serine proteinase) 对 BmNPV 有较强的抗病毒活性; 姚慧鹏等 (2008) 和王燕红等 (2008) 从野桑蚕 *Bombyx mandarina* 克隆了脂肪酶和丝氨酸蛋白酶的基因, 表达产物显示对 BmNPV 的感染有抑制作用。这些研究是家蚕抗病毒分子免疫学研究的良好开端。

薛英伟等 (2009) 和谢洪霞等 (2009) 研究证实柘叶 *Cudrania tricuspidata* 饲养的家蚕对 BmNPV 的抗

基金项目: 公益性行业 (农业) 科研专项 (nyhyzx07-020-01); 国家现代农业产业技术体系建设专项 (nycytx-27-gw203)

作者简介: 王晓强, 男, 1985 年生, 甘肃陇南人, 硕士研究生, 主要从事无脊椎动物病原微生物相关的研究, E-mail: xqiangwang@yeah.net

* 通讯作者 Corresponding author, Tel.: 023-68251585; E-mail: canbl3312@126.com

收稿日期 Received: 2010-08-29; 接受日期 Accepted: 2011-01-31

感染能力和耐病能力显著低于桑叶 *Morus alba* 饲养的家蚕，易暴发血液型脓病。为探讨柘叶饲养家蚕易发生血液型脓病的机制，本实验通过用柘叶饲养家蚕构建的易感染病蚕系统，比较了柘叶和桑叶饲养蚕消化液中红色荧光蛋白、脂肪酶和丝氨酸蛋白酶(胰蛋白酶和糜蛋白酶)等抗病毒蛋白活性的差异。

1 材料与方法

1.1 材料

供试家蚕品种为两广 2 号。桑叶采自西南大学桑园的扶桑品种；柘叶采自西南大学校内。

1.2 不同叶位柘叶和桑叶叶绿素含量的测定

采用丙酮提取法测定叶绿素含量 (Arnon, 1949; 杨敏文, 2002)。选取生长发育正常、无病虫害的 2, 4, 6, 8 位柘叶叶片，洗净晾干，剪碎(去掉中脉)，混匀。分别称取特定叶位已剪碎的新鲜样品 0.5 g，放入研钵中，加少量石英砂和 5.0 mL 80% 乙醇研成匀浆，静置 3~5 min。过滤并定容至 10 mL，取 5.0 mL 转入棕色容量瓶中，以 80% 丙酮定容至 25 mL。检测 663 nm 和 645 nm 处吸光度。按照下列 Arnon 公式 (Arnon, 1949; 杨敏文, 2002) 计算叶绿素浓度：

叶绿素 a 的浓度 (mg/L)： $C_a = 12.7A_{663} - 2.69A_{645}$ ；

叶绿素 b 的浓度 (mg/L)： $C_b = 22.9A_{663} - 4.68A_{645}$ ；

叶绿素总浓度 (mg/L)： $C_{a+b} = C_a + C_b$ 。

桑叶叶绿素含量的测定同柘叶。重复 3 次。

1.3 家蚕消化液的收集

从蚁蚕到 3 龄，采用桑叶常规饲养，4 龄起蚕分 a、b 两个处理组，a 处理组改用柘叶饲养，b 处理组继续用桑叶饲养。5 龄第 1 天起隔天于每组中随机抽样 25 头家蚕以 40 V 电击收集消化液(崔颖俊等, 2008)。

1.4 家蚕消化液中红色荧光蛋白 (RFP) 的粗提取及荧光强度测定

分别吸取 5 龄桑叶饲养起蚕和 5 龄柘叶饲养起蚕的消化液各 300 μ L，用蒸馏水稀释至 1.0 mL。用醋酸调 pH 值至 7.4，平衡 30 min 后，加入预冷的干燥硫酸铵粉末至 40% 饱和和硫酸铵溶液，以 10 000 rpm 离心 30 min，取沉淀物加入 50.0 mmol/L，pH 7.4 Tris 缓冲液于 4℃ 进行透析，每 3 h 换一次透析液，透析 24 h。透析后在样品中以体积比 1:1 加入预冷的丙酮进行脱色，5 000 rpm 离心 3 min，取沉淀稀释至原体积，用荧光分光光度计在激发波长 570 nm、发射波长 612 nm 下，测定荧光强度。测量重复 3 次。

1.5 家蚕消化液中抗病毒蛋白活性的测定

脂肪酶和胰蛋白酶活性的测定采用南京建成生物试剂公司生产的试剂盒。糜蛋白酶活性的测定依照 Stellmach (1992) 完成。用移液管将 5.0 mL 底物缓冲液(底物为戊二酰-L-P-硝基苯胺，缓冲液为 pH 7.8 的 0.005 mol/L Tris 缓冲液，内含 7.992 mg $CaCl_2$ /100 mL Tris 缓冲液)，移入一试管，加入 0.9 mL 蒸馏水，38℃ 水浴 5 min，再加入 0.1 mL 小肠液，38℃ 水浴 60 min，以 30% 乙酸终止反应，在 410 nm 处以空白为参比测定吸光度，用 0.5 mL 蒸馏水代替肠液测定空白值。通过建立戊二酰-L-P-硝基苯胺盐酸盐标准曲线计算糜蛋白酶的活性。测量重复 3 次。

1.6 数据统计与分析

实验数据均采用统计软件 SPSS 12.0 进行分析。桑叶和柘叶饲养蚕在 5 龄起蚕以及整个 5 龄红色荧光蛋白、脂肪酶和丝氨酸蛋白酶活性的差异均采用 *t* 检验进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 不同叶位柘叶和桑叶的叶绿素含量

由表 1 中可以看出，随着叶位的下降即叶质成熟度的增加，桑叶和柘叶的叶绿素 a (Chla)、叶绿

表 1 不同叶位柘叶和桑叶的叶绿素含量

Table 1 Chlorophyll content in the blade at different leaf positions of cudrang and mulberry

叶位 Leaf position	Chla (mg/g FW)		Chlb (mg/g FW)		Chl (mg/g FW)		比值 Ratio *	
	柘叶 Cudrang	桑叶 Mulberry	柘叶 Cudrang	桑叶 Mulberry	柘叶 Cudrang	桑叶 Mulberry	柘叶 Cudrang	桑叶 Mulberry
2	2.32 ± 0.09 a(b)	1.46 ± 0.09 a(a)	0.76 ± 0.02 a(b)	0.45 ± 0.15 a(a)	3.07 ± 0.06 a(b)	1.91 ± 0.10 a(a)	1.00	1.00
4	2.47 ± 0.05 ab(b)	2.18 ± 0.06 b(a)	0.86 ± 0.03 a(a)	0.69 ± 0.09 b(a)	3.33 ± 0.07 b(b)	2.86 ± 0.6 b(a)	1.09	1.50
6	2.56 ± 0.12 b(a)	2.71 ± 0.17 c(a)	0.96 ± 0.17 b(a)	0.97 ± 0.02 c(a)	3.52 ± 0.08 c(a)	3.62 ± 0.11 c(b)	1.15	1.90
8	2.97 ± 0.08 c(a)	3.16 ± 0.09 d(a)	1.37 ± 0.02 c(b)	1.25 ± 0.03 d(a)	4.32 ± 0.07 d(a)	4.41 ± 0.06 d(a)	1.41	2.31

* 比值 = 第 *x* 位叶 Chl 含量/第 2 位叶 Chl 含量 Ratio = Chl content in the blade at the *x*th leaf position/Chl content in the blade at the 2nd leaf position. 表中数据为平均值 ± 标准误；同列数据后不同的小写字母代表不同叶位的差异显著 (*P* < 0.05)；两种叶同行数据后括号内的不同小写字母代表差异显著 (*P* < 0.05)。Data in the table are means ± SE; means within the same column followed by different small letters are significantly different at *P* < 0.05, and those in the same row followed by different letters in brackets are significantly different at *P* < 0.05.

素 b (Chlb) 的单位重量及叶绿素 (Chl) 总含量均表现出上升趋势, 高叶位柘叶即嫩叶的 Chl 含量高于同叶位的桑叶, 而低叶位即成熟叶二者的 Chl 含量比较接近, t 检验差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.2 柘叶和桑叶饲养家蚕肠道的荧光特征

从图 1 中可以看出, 在 365 nm 紫外光照射下蚕体会发出红色荧光和黄色荧光, 而且红色荧光

蛋白主要分布在前肠和中后肠。同时还发现桑叶饲养蚕的肠道粗壮, 柘叶饲养蚕的肠道瘦弱; 而在 5 龄蚕上簇前 1–2 d, 黄色荧光蛋白的含量会增多。

桑叶饲养组蚕消化液的荧光强度 (26.93 ± 2.41) 比柘叶饲养组的荧光强度 (25.25 ± 2.13) 稍强, t 检验差异不显著 ($P > 0.05$)。

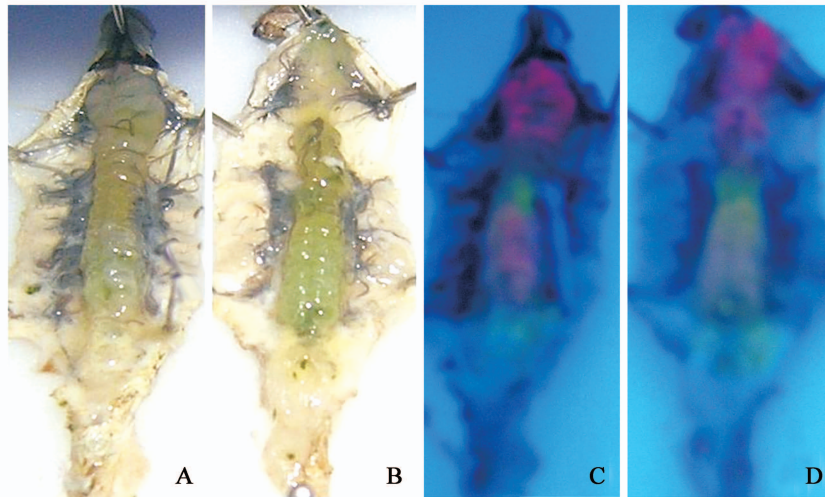


图 1 在可见光和紫外光下桑叶和柘叶饲养的家蚕 5 龄幼虫的肠道

Fig. 1 The intestine of 5th instar larvae of *Bombyx mori* reared on leaves of mulberry and cudrang under visible and UV light

A: 桑叶, 可见光 Mulberry, under visible light; B: 柘叶, 可见光 Cudrang, under visible light; C: 桑叶, 紫外光 Mulberry, under UV light; D: 柘叶, 紫外光 Cudrang, under UV light.

2.3 柘叶和桑叶饲养的家蚕幼虫消化液中脂肪酶的活性差异

从 5 龄第 1 天开始隔天测定不同饲料饲养家蚕的脂肪酶活性 (表 2), 结果显示整个 5 龄期柘叶饲养组和桑叶饲养组脂肪酶活性平均值分别为 $1\,421.71 \pm 202.60$ 和 $1\,976.03 \pm 139.92$ U/L, t 检验差异显著 ($P < 0.05$)。不同饲养组起蚕脂肪酶的平均活性分别为 $1\,493.58 \pm 20.12$ 和 $2\,143.16 \pm 6.71$ U/L, 经 t 检验差异显著 ($P < 0.05$)。

2.4 柘叶和桑叶饲养的家蚕幼虫消化液中胰蛋白酶的活性差异

从家蚕 5 龄第 1 天起隔天开始测定不同饲料饲养家蚕的胰蛋白酶活性 (表 3), 结果显示 5 龄期柘叶饲养组和桑叶饲养组胰蛋白酶的平均活性分别为 19.67 ± 8.17 和 199.18 ± 181.71 U/mL, 起蚕柘叶饲养组和桑叶饲养组的胰蛋白酶平均活性分别为 20.36 ± 0.25 和 440.01 ± 1.89 U/mL, 经 t 检验均差异显著 ($P < 0.05$)。桑叶饲养蚕胰蛋白酶的活性在起蚕期最高, 随日龄变化逐渐降低; 而柘叶饲养组胰蛋白酶的活性在起蚕期和熟蚕期均较低, 在第

3 天达到最大值。

表 2 柘叶和桑叶饲养的家蚕 5 龄幼虫消化液中脂肪酶活性 (U/L) 的差异

Table 2 Difference of lipase activity (U/L) in digestive juice of the 5th instar larvae of *Bombyx mori* reared on cudrang and mulberry leaves

饲养时间 (d) Rearing time	脂肪酶活性 Lipase activity (U/L)	
	桑叶 Mulberry	柘叶 Cudrang
1	$2\,143.16 \pm 6.71$ d	$1\,493.58 \pm 20.12$ c
3	$1\,846.82 \pm 3.35$ a	$1\,654.79 \pm 6.71$ e
5	$1\,875.27 \pm 3.35$ b	$1\,453.27 \pm 3.35$ d
7	$2\,038.85 \pm 13.41$ c	$1\,406.86 \pm 11.47$ b
9	–	$1\,100.03 \pm 13.41$ a
平均值 Average	$1\,976.03 \pm 139.92$ (b)	$1\,421.71 \pm 202.60$ (a)

–: 蚕已经上簇 Silkworms have mounted cocoon. 同列数据后不同的小写字母代表不同天数的差异显著 ($P < 0.05$); 同行数据后括号内的不同小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$)。Means within the same column followed by different small letters are significantly different at $P < 0.05$, and those in the same row followed by different letters in brackets are significantly different at $P < 0.05$. 表 3 和表 4 同 The same for Tables 3 and 4.

表3 柘叶和桑叶饲养的家蚕5龄幼虫消化液中胰蛋白酶活性的差异

Table 3 Difference of trypsin activity in digestive juice of the 5th instar larvae of *Bombyx mori* reared on leaves of cudrang and mulberry

饲养时间(d) Rearing time	胰蛋白酶活性 Trypsin activity (U/mL)	
	桑叶 Mulberry	柘叶 Cudrang
1	440.01 ± 1.89 d	20.36 ± 0.25 c
3	274.01 ± 0.94 c	32.67 ± 0.94 d
5	74.02 ± 0.94 b	15.94 ± 1.50 b
7	8.67 ± 2.83 a	18.82 ± 0.76 c
9	—	10.58 ± 1.06 a
平均值 Average	199.18 ± 181.71 (b)	19.67 ± 8.17 (a)

2.5 柘叶和桑叶饲养的家蚕消化液中糜蛋白酶的活性差异

从家蚕5龄第1天开始隔天测定不同饲料饲养家蚕的糜蛋白酶活性(表4),结果显示5龄期柘叶饲养组和桑叶饲养组的糜蛋白酶平均活性分别为32.76 ± 19.34 和33.44 ± 15.72 U/mL, *t* 检验差异不显著($P > 0.05$),起蚕柘叶饲养组和桑叶饲养组的糜蛋白酶平均活性分别为12.53 ± 0.08 和56.92 ± 0.03 U/mL, *t* 检验差异极显著($P < 0.01$)。桑叶饲养组糜蛋白酶的活性在起蚕期最高,随日龄变化逐渐降低,与胰蛋白酶活性表现出基本相同的规律性变化;而柘叶饲养组糜蛋白酶的活性在起蚕期最低,在第3天达到最大值。

表4 柘叶和桑叶饲养的家蚕5龄幼虫消化液中糜蛋白酶活性的差异

Table 4 Difference of chymotrypsin activity in digestive juice of the 5th instar larvae of *Bombyx mori* reared on cudrang and mulberry leaves

饲养时间(d) Rearing time	糜蛋白酶活性 Chymotrypsin activity (U/mL)	
	桑叶 Mulberry	柘叶 Cudrang
1	56.92 ± 0.03 c	12.53 ± 0.08 a
3	34.91 ± 0.05 b	55.17 ± 0.05 e
5	21.02 ± 0.05 a	52.50 ± 0.07 d
7	21.01 ± 0.13 a	30.25 ± 0.08 c
9	—	13.35 ± 0.03 b
平均值 Average	33.44 ± 15.72 (a)	32.76 ± 19.34 (a)

3 讨论

家蚕对BmNPV的抗性机理是一个非常复杂的生物学问题,具体涉及到家蚕抗NPV相关基因的

表达、调控,家蚕体内某些天然免疫分子的活性,家蚕消化液中抗病毒蛋白,以及气候等因素。本研究却发现家蚕经柘叶饲养后消化液中红色荧光蛋白(RFP)的强度稍低于桑叶饲养组,但柘叶饲养蚕消化液中脂肪酶、胰蛋白酶的活性显著低于桑叶饲养蚕。同时还发现柘叶和桑叶两个饲养组在5龄上簇前1-2d黄色荧光蛋白的含量均会增多。

红色荧光蛋白(RFP)是家蚕中肠上皮细胞分泌的一种抗BmNPV活性蛋白,其可能的合成机制是饲料中的叶绿素a被氧化成叶绿素酸酯a与家蚕中肠蛋白结合而成叶绿素a-中肠蛋白复合体,但是其抗病毒的原因多年来一直无法达成共识(Uchida *et al.*, 1981)。叶绿素含量调查结果显示,桑叶和柘叶的叶绿素含量随叶位的下降(即叶质成熟度的增加)均呈上升趋势,高叶位柘叶(嫩叶)的Chl含量高于高叶位桑叶的含量,而低叶位(成熟叶)中二者的Chl含量比较接近。在本实验中大蚕期正是采用低叶位的柘叶和桑叶饲养家蚕,由于叶绿素的含量无大的差异,因此,RFP的合成及表现的强度未出现明显的差异,说明RFP不是柘叶饲养蚕抗感染能力低于桑叶饲养蚕的直接原因。而桑叶饲养组蚕消化液中荧光强度比柘叶饲养组的稍强,其原因可能是桑叶饲养组每头蚕的消化液总量大于柘叶饲养组。黄色荧光蛋白在5龄上簇前1-2d含量才会增多,推测其功能可能与家蚕的吐丝结茧有关,还有待进一步研究。

崔颖俊等(2008)研究发现家蚕幼虫消化液中的蛋白质种类较少,分布集中,脂肪酶和丝氨酸蛋白酶是目前公认为确实存在而又重要的消化酶(王干治,1958),也是首次从昆虫肠道消化液内分离纯化的2个抗病毒蛋白。研究表明,随着蚕龄的增长,蚕的抗感染力逐步提高,同一龄中起蚕的感染抵抗性最弱,随食桑以后逐渐增强(曹诒孙等,1965; Aratake *et al.*, 1973)。本实验从同一时间起点(4龄起蚕)分别用柘叶和桑叶饲养,5龄起隔天随机抽样同时分别测定2个饲养组家蚕消化液中脂肪酶、胰蛋白酶和糜蛋白酶的活性。测定结果表明,起蚕对感染入侵的BmNPV灭活作用差,或许是易爆发核多角体病的重要原因。

在5龄期,尽管柘叶饲养蚕的糜蛋白酶与桑叶饲养蚕的无差异,但前者脂肪酶和胰蛋白酶活性显著低于后者。这就表明胰蛋白酶和脂肪酶不仅对起蚕感染的BmNPV有灭活作用外,还在家蚕整个5龄期对BmNPV的抗感染过程中扮演着重要的角色。胰蛋白酶对BmNPV的抗性可能由于家蚕体内免疫活性肽的合成以及许多依赖丝氨酸蛋白酶生理

功能的实现和特异性的蛋白表达 (Ramsey *et al.*, 2001; 张智明, 2006; 王燕红等, 2008), 使得家蚕的抗性提高所致 (Washburn *et al.*, 1996; Stöven *et al.*, 2000)。但是对于 BmNPV 来说, 目前的研究还无法把脂肪酶与 BmNPV 的各个生命活动过程联系起来, 是脂肪酶启动了家蚕生理代谢中的某些防御反应, 或者脂肪酶本身就是一个抗 BmNPV 蛋白, 这些都需要我们做更进一步的研究。

本实验结果表明脂肪酶和胰蛋白酶活性水平可以反映家蚕的抗 BmNPV 水平, 这与刘震等 (2009) 的研究结果一致。在家蚕抗性品种的选育中, 可将测定家蚕中肠脂肪酶和胰蛋白酶的活性作为选育和鉴定抗 BmNPV 家蚕品种的一种辅助方法。

参考文献 (References)

- Aratake Y, Kayamura T, Ueno H, 1973. Studies on factors affecting the susceptibility of the silkworm, *Bombyx mori* L. *Bulletin of the Imperial Sericultural Experiment Station*, (25): 307–346.
- Arnon DI, 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, 24: 1–15.
- Cao YS, Wu YL, Wang KR, Qian YJ, 1965. The relationship of incubation period and infection rate with infection period and infective dose of *Bombyx mori* nucleopolyhedrosis. *Acta Sericologica Sinica*, 3(3): 174–179. [曹治孙, 吴友良, 王坤荣, 钱元骏, 1965. 家蚕血液型脓病的潜伏期和感染率与病毒感染时期及感染量的关系. 蚕业科学, 3(3): 174–179]
- Chen SL, Li TX, 2004. Understand Virus. China Agriculture Press, Beijing. 118–119. [陈绳亮, 李天宪, 2004. 了解病毒. 北京: 中国农业出版社. 118–119]
- Cui YJ, Qiu ZY, Zhao QL, Shen XJ, Tang SM, Guo XJ, 2008. Proteomic analysis of digestive juice from silkworm (*Bombyx mori*) larvae. *Acta Sericologica Sinica*, 34(1): 50–53. [崔颖俊, 裴智勇, 赵巧玲, 沈兴家, 唐顺明, 郭锡杰, 2008. 家蚕幼虫消化液蛋白质组学分析. 蚕业科学, 34(1): 50–53]
- Hayashiya K, 1978. Red fluorescent protein in the digestive juice of the silkworm larvae fed on host-plant mulberry leaves. *Entomol. Exp. Appl.*, 24: 228–236.
- Liu Z, Bao XX, You ZY, Yang Y, Xu JP, 2009. The relationship between the resistance of silkworm against BmNPV and the activity of digestive enzymes. *Journal of Anhui Agricultural University*, 36(3): 489–492. [刘震, 鲍先巡, 尤征英, 杨莹, 徐家萍, 2009. 家蚕对 BmNPV 抗病性与中肠消化酶活性的关系. 安徽农业大学学报, 36(3): 489–492]
- Nakazawa H, Tsuneishi E, Ponnuvel KM, Furukawa S, Asaoka A, Tanaka H, Ishibashi J, Yamakawa M, 2004. Antiviral activity of a serine protease from the digestive juice of *Bombyx mori* larvae against nucleopolyhedrovirus. *Virology*, 321: 154–162.
- Ponnuvel KM, Nakazawa H, Furukawa S, Asaoka A, Ishibashi J, Tanaka H, Yamakawa M, 2003. A lipase isolated from the silkworm *Bombyx mori* shows antiviral activity against nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology*, 77(19): 10725–10729.
- Ramsey AH, Skonieczny P, Coolidge DT, Kurzynski TA, Proctor ME, Davis JP, 2001. *Burkholderia cepacia* lower respiratory tract infection associated with exposure a respiratory therapist. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 2001, 22(7): 423–426.
- Söven S, Ando I, Kadalayil L, Engström Y, Hultmark D, 2000. Activation of the *Drosophila* NF-kappaB factor Relish by rapid endoproteolytic cleavage. *EMBO Rep.*, 1(4): 347–352.
- Stellmach B (translated by Qian JY), 1992. Bestimmungsmethoden Enzyme. China Light Industry Press, Beijing. 120–127. [Stellmach B (钱嘉渊译), 1992. 酶的测定方法. 北京: 中国轻工业出版社. 120–127]
- Uchida Y, Hayashiya K, 1981. Biosynthesis of a red fluorescent protein (RFP) in the digestive juice of silkworm larvae *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). Formation of a chlorophyllide-a-midgut protein complex. *Japanese of Society of Applied Entomology and Zoology*, 25: 94–100.
- Wang GZ, 1958. Silkworm Physiology. Jiangsu People's Publishing House, Nanjing. 17–18. [王干治, 1958. 蚕体生理学. 南京: 江苏人民出版社. 17–18]
- Wang YH, Li B, Wang D, Zhu S, Zhao HQ, Wei ZG, Shen WD, 2008. Construction of midgut tissue-specific cDNA library of *Bombyx mandarina* M. and isolation and sequence analysis of serine protease gene fragment. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 36(27): 11663–11665. [王燕红, 李兵, 王东, 朱莎, 赵华强, 卫正国, 沈卫德, 2008. 野桑蚕中肠组织 cDNA 文库的构建及丝氨酸蛋白酶基因片段的克隆与序列分析. 安徽农业科学, 36(27): 11663–11665]
- Washburn JO, Kirkpatrick BA, Volkman LE, 1996. Insect protection against viruses. *Nature*, 383: 767.
- Xie HX, Tu Z, Wan YJ, Xue YW, Feng LC, Wang XQ, 2009. Effects of different forages on BmNPV resistance and activities of three metabolic enzymes of silkworm (*Bombyx mori* L.). *Acta Sericologica Sinica*, 35(3): 642–647. [谢洪霞, 涂增, 万永继, 薛英伟, 冯丽春, 王晓强, 2009. 不同饲料饲养对家蚕抗核型多角体病毒病的能力以及体内 3 种代谢酶活性的影响. 蚕业科学, 35(3): 642–647]
- Xue YW, Tu Z, Wan YJ, Xiang YQ, Xie HX, Feng LC, 2009. Effects of tricuspid *cudrania* leaves on growth and development and activity of three metabolic enzymes in the silkworm (*Bombyx mori*). *Acta Sericologica Sinica*, 35(2): 408–411. [薛英伟, 涂增, 万永继, 向芸庆, 谢洪霞, 冯丽春, 2009. 用柘树叶饲养家蚕对蚕体生长发育及 3 种代谢酶活性的影响. 蚕业科学, 35(2): 408–411]
- Yang MW, 2002. Study on rapid determination of chlorophyll content of leaves. *Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory*, 19(4): 478–481. [杨敏文, 2002. 快速测定植物叶片叶绿素含量方法的探讨. 光谱实验室, 19(4): 478–481]
- Yao HP, He FQ, Guo AQ, Cao CP, Lu XM, Wu XF, 2008. Cloning of an antiviral protein gene (*lipase*) from Chinese wild silkworm, *Bombyx mandarina* Moore and its bioactivity assay. *Acta Sericologica Sinica*, 34(3): 466–471. [姚慧鹏, 何芳青, 郭爱芹, 曹翠平, 鲁兴萌, 吴小锋, 2008. 中国野桑蚕抗病毒蛋白基因 (*lipase*) 的克隆与活性鉴定. 蚕业科学, 34(3): 466–471]
- Zhang ZM, 2006. Progress in studies of thrombin. *Strait Pharmaceutical Journal*, 18(6): 1–3. [张智明, 2006. 凝血酶的研究进展. 海峡药学, 18(6): 1–3]

(责任编辑: 赵利辉)